

角膜上皮幹細胞ニッチにおけるN-cadherin発現細胞

著者	林 竜平
号	78
学位授与番号	3432
URL	http://hdl.handle.net/10097/45952

氏 名（本籍）

はやし
林

りゅう
竜

へい
平

学 位 の 種 類

博 士（医 学）

学 位 記 番 号

医 第 3 4 3 2 号

学位授与年月日

平 成 21 年 2 月 27 日

学位授与の条件

学位規則第 4 条第 2 項該当

最 終 学 歴

平 成 14 年 3 月 31 日

神戸大学大学院自然科学研究科

生物機能化学専攻 修了

学 位 論 文 題 目

角膜上皮幹細胞ニッチにおける N-cadherin 発現
細胞

（主 査）

論 文 審 査 委 員

教授 西 田 幸 二

教授 阿 部 俊 明

教授 菅 村 和 夫

論文内容要旨

組織（体性）幹細胞は骨髄、表皮、毛包、腸管上皮、脳、角膜上皮など数多くの成体組織中に存在している。これら組織幹細胞は多分化能および自己複製能を有しており、再生医療のための細胞源として注目されている。

組織幹細胞の中でも、骨髄の造血幹細胞、さらに表皮、腸管上皮、角膜上皮などの上皮系幹細胞は最も詳細に研究されている幹細胞モデルである。表皮においては、上皮幹細胞は毛包部のバルジと呼ばれる特異的部位に、角膜上皮においては、角膜と結膜の間にある輪部と呼ばれる組織の上皮基底部に存在することが知られている。角膜上皮幹細胞モデルは、未分化な角膜上皮幹細胞が存在する輪部上皮領域と、より分化した TA 細胞や分化角膜上皮細胞が存在する角膜中央部上皮が空間的に分かれて存在していることから、上皮系幹細胞の研究用モデルとして広く利用されている。しかし一方で、角膜上皮幹細胞の局在は明らかにされているものの、幹細胞維持機構、つまり幹細胞ニッチについての大部分が不明である。

幹細胞ニッチとは“幹細胞維持に必要な特異的微細環境”であり、幹細胞ニッチ内において幹細胞は未分化性を維持することが可能である。幹細胞ニッチの構成要素としては、液性因子、細胞外基質、細胞間接着分子など数多くの因子が関わっており、これら因子が複合的に作用することにより、幹細胞の未分化性が維持されていると推測される。

近年、造血幹細胞ニッチにおいて造血幹細胞が、紡錘型 N-cadherin 陽性/CD45 陰性の骨芽細胞と、N-cadherin を介し接着して存在することが報告された。造血幹細胞と骨芽細胞の細胞間接着に関与している N-cadherin は組織幹細胞の長期間にわたる未分化性の維持に重要な役割を果たしていることが推測された。

本研究では、上皮幹細胞の未分化性維持機構の解明を目的として、角膜上皮幹細胞ニッチにおける細胞接着分子 N-cadherin の関与について検討した。

N-cadherin の免疫染色の結果、N-cadherin は角膜上皮幹細胞が存在するとされる輪部上皮基底部に散発的に認められたが、一方で角膜上皮では認められなかった。FACS 解析の結果からも、N-cadherin 陽性細胞は輪部上皮にのみ約 9.9% 存在したが、一方で角膜上皮には殆ど認められなかった。次にセルソーティングにより単離した N-cadherin 陽性細胞を解析したところ、N-cadherin 陽性細胞は陰性細胞に比較して有意に高いコロニー形成能および幹細胞マーカー発現を示したことから、N-cadherin 陽性細胞は角膜上皮幹細胞・前駆細胞であると考えられた。さらに 2 重免疫染色の結果から、N-cadherin 陽性細胞は N-cadherin を介してメラノサイトと接着して存在していることが明らかとなった。また、N-cadherin 陽性細胞を 3T3 フィーダーレイヤー上で共培養したところ、少なくとも培養後 24 時間では N-cadherin 発現は維持されていた。

が、培養9日後においては、N-cadherin 発現は著しく減弱した。

以上の結果から、N-cadherin は角膜上皮幹細胞・前駆細胞に特異的に発現しており、メラノサイト（推定ニッチ細胞）との細胞間接着分子として働き、輪部上皮基底部分における角膜上皮幹細胞ニッチ形成に寄与していると考えられた。また、増殖した角膜上皮幹細胞・前駆細胞のN-cadherin 発現が減弱したことから、N-cadherin は幹細胞における増殖の制御に関与していると考えられた。

審査結果の要旨

組織（体性）幹細胞は骨髄、表皮、毛包、腸管上皮、脳、角膜上皮など数多くの成体組織中に存在している。これら組織幹細胞は多分化能および自己複製能を有しており、再生医療のための細胞源として注目されている。

組織幹細胞の中でも、骨髄の造血幹細胞、さらに表皮、腸管上皮、角膜上皮などの上皮系幹細胞は最も詳細に研究されている幹細胞モデルである。表皮においては、上皮幹細胞は毛包部のバルジと呼ばれる特異的部位に、角膜上皮においては、角膜と結膜の間にある輪部と呼ばれる組織の上皮基底部に存在することが知られている。角膜上皮幹細胞モデルは、未分化な角膜上皮幹細胞が存在する輪部上皮領域と、より分化した TA 細胞や分化角膜上皮細胞が存在する角膜中央部上皮が空間的に分かれて存在していることから、上皮系幹細胞の研究用モデルとして広く利用されている。しかし一方で、角膜上皮幹細胞の局在は明らかにされているものの、幹細胞維持機構、つまり幹細胞ニッチについての大部分が不明であった。

幹細胞ニッチとは“幹細胞維持に必要な特異的微細環境”であり、幹細胞ニッチ内において幹細胞は未分化性を維持することが可能である。幹細胞ニッチの構成要素としては、液性因子、細胞外基質、細胞間接着分子など数多くの因子が関わっており、これら因子が複合的に作用することにより、幹細胞の未分化性が維持されていると推測されている。

本研究では、上皮幹細胞の未分化性維持機構の解明を目的として、角膜上皮幹細胞ニッチにおける細胞接着分子 N-cadherin の関与について検討している。

N-cadherin の免疫染色の結果、N-cadherin は角膜上皮幹細胞が存在するとされる輪部上皮基底部に散発的に認められたが、一方で角膜上皮では認められなかった。FACS 解析の結果からも、N-cadherin 陽性細胞は輪部上皮にのみ約 9.9% 存在したが、一方で角膜上皮には殆ど認められなかった。次にセルソーティングにより単離した N-cadherin 陽性細胞を解析したところ、N-cadherin 陽性細胞は陰性細胞に比較して有意に高いコロニー形成能および幹細胞マーカー発現を示したことから、N-cadherin 陽性細胞は角膜上皮幹細胞・前駆細胞であると考えられた。さらに 2 重免疫染色の結果から、N-cadherin 陽性細胞は N-cadherin を介してメラノサイトと接着して存在していることが明らかとなった。また、N-cadherin 陽性細胞を 3T3 フィーダーレイヤー上で共培養したところ、少なくとも培養後 24 時間では N-cadherin 発現は維持されていたが、培養 9 日後においては、N-cadherin 発現は著しく減弱した。

以上の結果から、N-cadherin は角膜上皮幹細胞・前駆細胞に特異的に発現しており、メラノサイト（推定ニッチ細胞）との細胞間接着分子として働き、輪部上皮基底部における角膜上皮幹細胞ニッチ形成に寄与していると考えられた。また、増殖した角膜上皮幹細胞・前駆細胞の N-cadherin 発現が減弱したことから、N-cadherin は幹細胞における増殖の制御に関与していると考えられた。

本研究は、N-cadherin の上皮幹細胞ニッチへの関与を始めて報告しており、上皮幹細胞ニッチ解明に向けて大きな意義があると考えられる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。